Untersuchungen über die Anwendung des Prinzips der Endoplatte auf andere Substrate zur biochemischen Testung von Enterobacteriaceen

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

—

vorgelegt von

Aloys K. Lubega

—

Saarbrücken

—

1970

1969

—

Druck:
Universitätsbibliothek Saarbrücken

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes, Homburg / Saar.
(Direktor: Prof.Dr.med.,Dr.Phil.,Dipl.chem.W.Zimmermann)

Untersuchungen über die Anwendung des Prinzips der Endoplatte auf andere Substrate zur biochemischen Testung von Enterobacteriaceen.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER
UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von
Aloys K. Lubega

Dekan: Prof. Dr. med. H. Witter
Referent: Prof.Dr.med.,Dr.phil.,Dipl.chem.W.Zimmermann

Promotionsdatum: 1.12.1969

I N H A L T

		Seite
I.	EINLEITUNG	3
II.	ENTWICKLUNG DER ANSCHAUUNGEN ÜBER DEN WIRKUNGSMECHANISMUS DER ENDO-PLATTE	5
III.	EXPERIMENTELLER TEIL	17
	a) Werden aus allen für die biochemischen Bestimmungen gebräuchlichen Energiequellen auf der Endoplatte Aldehyde gebildet?	18
	1.) Methodik	
	2.) Ergebnisse	
	b) Verwendung der Endo-Platte als Indikatormedium zur biochemischen Bestimmung von Enterobakterien	24
IV.	DISKUSSION DER ERGEBNISSE	27
V.	ZUSAMMENFASSUNG	30
VI.	LITERATURVERZEICHNIS	31

UNIV. LEIDEN BIBL.

I. Einleitung

Die Verwertung von Laktose durch einige Enterobakterien wurde von Endo erstmals 1904 zur biochemischen Differenzierung von E. coli herangezogen und ein Laktose-Indikator-Nährboden zur Typhus-Paratyphus-Enteritis-Differentialdiagnose entwickelt.

Auf der Endoplatte färben sich in dem Fall, daß Laktose von dem betreffenden Mikroorganismus verwertet wird, die Kolonien und teilweise auch deren Umgebung rot an. Da von Endo, von späteren Autoren und auch in verschiedenen Lehrbüchern verschiedene Erklärungen für das Zustandekommen der Reaktion gegeben werden, war es notwendig, vor Beginn unserer Untersuchung aus der Literatur nach Möglichkeit zu klären, auf welchen chemischen Grundlagen die Endoreaktion beruht.

SEIFERT hatte bereits 1942 die ENDO-Reaktion auf einige weitere Kohlenhydrate (Rhamnose, Laktose, Maltose, Xylose und Mannit) erweitert. Dabei gelang es ihm, eine Differenzierung der Keime der TPE- und Coli-Gruppe mit den erwähnten Differentialnährböden im Sinne einer "bunten Reihe" zu erreichen. (Vergleiche S. 4).

Wir untersuchten, ob die üblicherweise in zahlreichen Röhrchen pro Stamm angesetzten "bunten Reihen" auch auf die Weise durchgeführt werden können, daß auf jede Endoplatte mit jeweils einem Zucker mehrere Stämme aufgebracht und nach Bebrütung auch differenziert werden können.

Seit der ersten Beschreibung der Endoplatte sind verschiedene Modifikationen des Mediums bekannt geworden:

1) Originalmedium nach Endo (1904):

1000	ml neutralisierter Agar-Nährboden (3 % Agar) 2)
10	g chem. reiner Milchzucker
5	ml alkohol. Fuchsinlösung
25	ml 10 %iger Na_2SO_3 Lösung
10	ml 10 %iger Sodalösung

2: 1l aqua des., 30 g Agar-Agar, 10 g Pepton, 5 g NaCl

2) Eine haltbare Modifikation gibt Daranyi (1928) an: Sie ist wesentlich konzentrierter und enthält zusätzlich gesättigte Chrysoidinlösung. Dieser Nährboden soll wegen des hohen Zuckergehaltes besonders fördernd auf das Wachstum der Typhus- und Dysenteriebakterien wirken. Nach einer Bebrütungsdauer von 24 Stunden zeigen Coli-Bakterien rote, Typhus- und Dysenteriebakterien eine gelblich-grüne Färbung der Kolonien.

3) Eine weitere Modifikation stammt von Schriek (1938/39). Er setzt dem Endo-Agar außer Laktose noch 3 % Saccharose zu. Dadurch wird ein großer Teil der fermentschwachen Coli- bzw. Intermediusstämme mit negativer Laktose- aber positiver Saccharosevergärung mit erfasst.

4) 1942 führte Seiffert, wie vorher bereits erwähnt, ähnliche Untersuchungen durch. Zur diagnostischen Differenzierung der Typhus-Paratyphus-Enteritis- und Coli-Gruppe erfolgte ein Zusatz von Laktose, Mannit, Maltose, Xylose oder Rhamnose. Diese modifizierte Endoplatte wurde mit Kulturen der TPE- und Coli-Gruppe beimpft. Von Seiffert wurden die in Tabelle 1 zusammengefassten Ergebnisse erhalten:

Tabelle 1: Positive Endo-Reaktion nach Zusatz verschiedener Energiequellen anstelle von Laktose zur Endoplatte 1)

Organismus	Laktose	Mannit	Maltose	Xylose	Rhamnosa
E. Coli	+[2)]	+	+	+	+
Typhus-Bakt.Typ 1[3)]	-	+	+	+	-
Typhus-Bakt.Typ 2	-	+	+	+	-
Paratyph.-B-Bakt.	-	+	+	+	+
Paratyph.-A-Bakt.	-	+	+	-	+
Shiga-Ruhrbakt.	-	-	-	-	-
E-Ruhr-Kruse-Sonne	-	+	+	-	+
J-Ruhr-Schmitz	-	-	-	-	+-
Flexner-Ruhrbakt.	-	+	+	-	-
Y-Ruhrbakt.	-	+	-	-	-

1.) Rezept nach SEIFFERT (1942)

Zu 100,0 ml Nähragar wurden 1,0 g Zucker (o.ä.), 0,5 ml gesättig.alkohol.Fuchsinlösung und 2,5 ml Natriumsulfit zugesetzt.Von diesem (heißen) Nährboden wurde dann mit einer Pipette auf den Boden einer sterilen Petrischale ein Tropfen von etwa Einmarkstückgröße gegeben. (MIKRO-METHODE NACH SEIFFERT).

2.) + = Rötung

\- = keine Rötung

± = Rötung oder keine Rötung

3.) Die Namen der Bakterien wurden der Originalarbeit von Seiffert entnommen.

Damit war erstmals nachgewiesen worden, daß neben Laktose auch durch Verwendung einiger anderer Energiequellen eine positive Endoreaktion eintreten kann.

II. Entwicklung der Anschauungen über den Wirkungsmechanismus der Endo-Platte.

Die Ausarbeitung eines neuen Differenzierungsmediums durch Endo begann, nachdem sich herausgestellt hatte, daß das von

Drigalski und Conradi (1903) angegebene Medium nicht voll befriedigte. Aus der Veröffentlichung von Endo geht nicht hervor, welche Überlegungen ihn dazu geführt hatten, nicht mit einem einfachen pH-Indikator zu arbeiten, sondern auf das komplizierte System Fuchsin - Na_2SO_3 überzugehen, dessen Chemismus Endo nicht bekannt sein konnte. (Vergl. auch weiter unten).

Das Medium nach Endo besteht neben einem Grundnährboden aus Laktose als Substrat sowie Fuchsin und Natriumsulfit (Na_2SO_3) als Indikator. Die Fuchsinlösung färbt den Nährboden rot. Nach Zusatz von Na_2SO_3 tritt eine allmähliche Entfärbung ein, die jedoch erst nach Erstarren des Agars vollständig wird. Die frisch zubereitete Platte ist dann fast völlig farblos. Nach Beimpfung und einer Bebrütungsdauer von 15 Stunden bei 37° C färben sich die Kolonien der "Coli-Bakterien" vom Zentrum aus allmählich rot an. Nach 24 Stunden sind die Kolonien intensiv rot und zeigen oft "Fuchsinglanz". Dagegen bilden die Typhusbakterien farblose, am Rand flache Kolonien, wodurch eine makroskopische Unterscheidung der Bakterienarten möglich wird.

Zum Chemismus des Farbumschlages des Nährbodens schreibt Endo: "Fuchsin besteht wesentlich aus salzsaurem Rosanilin, $C_{20}H_{19}N_3HCl$. Rosanilin ist eine farblose sogenannte Leukobase, die mit verschiedenen Säuren wie HCl, Milchsäure u.a. einen roten Farbstoff bildet. Die Säurekomponente des roten Rosanilinsalzes wird durch Reduktionsmittel wie Na_2SO_3 leicht reduziert. Das dadurch entfärbte Rosanilin verbindet sich mit der durch Coli-Bakterien produzierten Säure und der Nährboden färbt sich schön rot".

Die von Endo entwickelte Hypothese ist in den letzten Jahren sowohl angegriffen als auch verteidigt worden. Bereits 1905 bemerkte MASCHAL, daß E. coli durch reine Säureproduktion die Leukobase nicht in rotes Fuchsin

umwandeln kann, wenn ein großer Überschuß von reduzierenden Na_2SO_3 vorliegt.
KENDALL (1916) bekräftigte die Theorie, daß die Endoreaktion durch Säuren hervorgerufen wird. "Bakterien, die Laktose spalten, z. B. Bakterium coli, bilden Milchsäure, welche die Rotfärbung in der unmittelbaren Nähe der Kolonien hervorruft. Einige Aldehyde lösen die gleiche Reaktion aus, aber es ist unwahrscheinlich, ob solche Aldehyde bei den laktosespaltenden Bakterien vorkommen."

Hardin und Ostenberg (1921) machen Acetaldehyd für die Endoreaktion verantwortlich. "Sobald der Aldehyd entstanden ist, verbindet er sich mit dem Reagenz und wird fixiert; dadurch wird verhindert, daß er zur Säure oxidiert wird."

Zinsser (1929) schreibt: "Nach Ansicht von Endo ist die Reaktion des Mediums abhängig von säurebildenden Bakterien. Dies scheint jedoch nicht den Tatsachen zu entsprechen. Säuren ergeben mit fuchsinschwefliger Säure keine Färbung. In der Chemie indessen verwendet man die fuchsinschweflige Säure unter dem Namen "Schiff's Reagenz" zum Nachweis von Aldehyden. Säuren heben die Rotfärbung auf, die durch Aldehyde hervorgerufen wurde. Dies ist die Ursache für die vielfach beobachtete Entfärbung roter Kolonien bei verlängerter Bebrütungszeit."

Nach Conn (1929) ist die Endoreaktion ähnlich, wenn nicht gar identisch mit dem Verhalten des Fuchsins im Schiff'schen Reagenz für den Nachweis von Aldehyden.

Lehmann und Neumann (1931) sind der Ansicht, daß nur säurebildende Organismen bei dem Endomedium eine Rotfärbung durch Regeneration von Fuchsin bewirken.

Margolena (1932/33) sieht beträchtliche Unklarheiten

im Verständnis der Endo-Reaktion infolge der Tatsache, daß eine geringe Färbung durch Säure und Oxidationen hervorgerufen wird. Beide bewirken ein Wiederauftreten der Fuchsinfarbe.

"Die typische Reaktion von E-coli wird nicht durch Milchsäure verursacht, sondern durch das Zwischenprodukt Acetaldehyd, das durch Natriumsulfit gebunden wird. Die Färbung, die bei der Reaktion entsteht, ist nicht Fuchsin. Das ergibt sich aus der Tatsache, daß die Färbung nach Zusatz von Äther nicht verschwindet, wenn man vorher Pikrinsäure zugegeben hat."

Seit etwa 1935 setzte sich die Auffassung durch, daß zumindest ein gebildeter Aldehyd die positive Endo-Reaktion bewirkt. Arbeiten über den Reaktionsmechanismus sind uns jedoch nicht bekannt geworden. In der Folge werden noch die Meinungen einiger Lehrbuch-Autoren in Zitatform aufgezählt.

Kelly und Hite (1949): "Die rote Farbe resultiert aus der Reaktion zwischen Aldehyd und Natriumsulfit."

Burrows (1949):"..... Das Wiederauftreten der Fuchsinfarbe wird durch Aldehyd bewirkt."

Müller (1950): "Fuchsinschweflige Säure ist ein Reagenz auf Formaldehyd."

Salle (1954): "Der Acetaldehyd ist ein Zwischenprodukt bei der Laktosevergärung und bildet ein Additionsprodukt mit Natriumsulfit. Die fuchsinschweflige Säure wird dann gespalten, wobei die ursprüngliche rote Farbe wieder entsteht."

Reploh und Otte (1965): "Aldehyde reagieren mit der fuchsinschwefligen Säure, wodurch der Farbstoff Fuchsin wieder frei wird."

Zusammengefaßt ergibt sich, daß sich zwar eine mehr oder weniger einheitliche Meinung zugunsten der Schiff's

Reagenz-Hypothese durchgesetzt hat, daß jedoch chemische Untersuchung zum Ablauf der Reaktion unter den im Endo-Medium durchaus verschiedenen Reaktionsbedingungen (Säure- bzw. Alkalibildung in Abhängigkeit von der Bakterienart und der Zeitdauer der Bebrütung) nicht vorliegen. Über den Aldehyd-Nachweis von Schiff mittels Fuchsin und Natriumsulfit liegt eine zusammenfassende Arbeit von Kasten (1960) vor, die sich jedoch primär auf den Chemismus bei der Färbung von Zellinhaltsstoffen bzw. Körpern bezieht. Daß die dieser Arbeit entnommenen Reaktionsabläufe auch für den Reaktionseintritt auf der Endoplatte Gültigkeit haben, ist zu vermuten. Der von Kasten gegebene Reaktionsablauf ist in Abb. 1 zusammengefasst.

Andere nicht aufgeführte Reaktionen sollen in Abhängigkeit von Variationen des pH-Wertes (vergleiche Abb. 2) der Anwesenheit von Mineralsäuren und organischen Säuren möglich sein.

Siehe Abbildung 1.

Anmerkung zur Abb. 1:
1. Der Übersichtlichkeit halber sind bei jeder Reaktionsstufe (III) nur zwei bzw. eine der verschiedenen mesomeren Verbindungen aufgeführt worden.

2. Die farbigen Fuchsin-Aldehyd-Derivate sind unterschiedlich intensiv gefärbt. Deswegen dürfte der Farbton der Endoplatte nach Lactosespaltung unterschiedlich stark ausgeprägt sein.

3. Während HSO_3^- aus dem Natriumsulfit im Medium entsteht, wird H^+ erst durch die im Stoffwechsel entstehenden Säuren gebildet, wodurch es erst zur Freisetzung von SO_2 und zur Bildung des eigentlichen Reagenzes kommt.

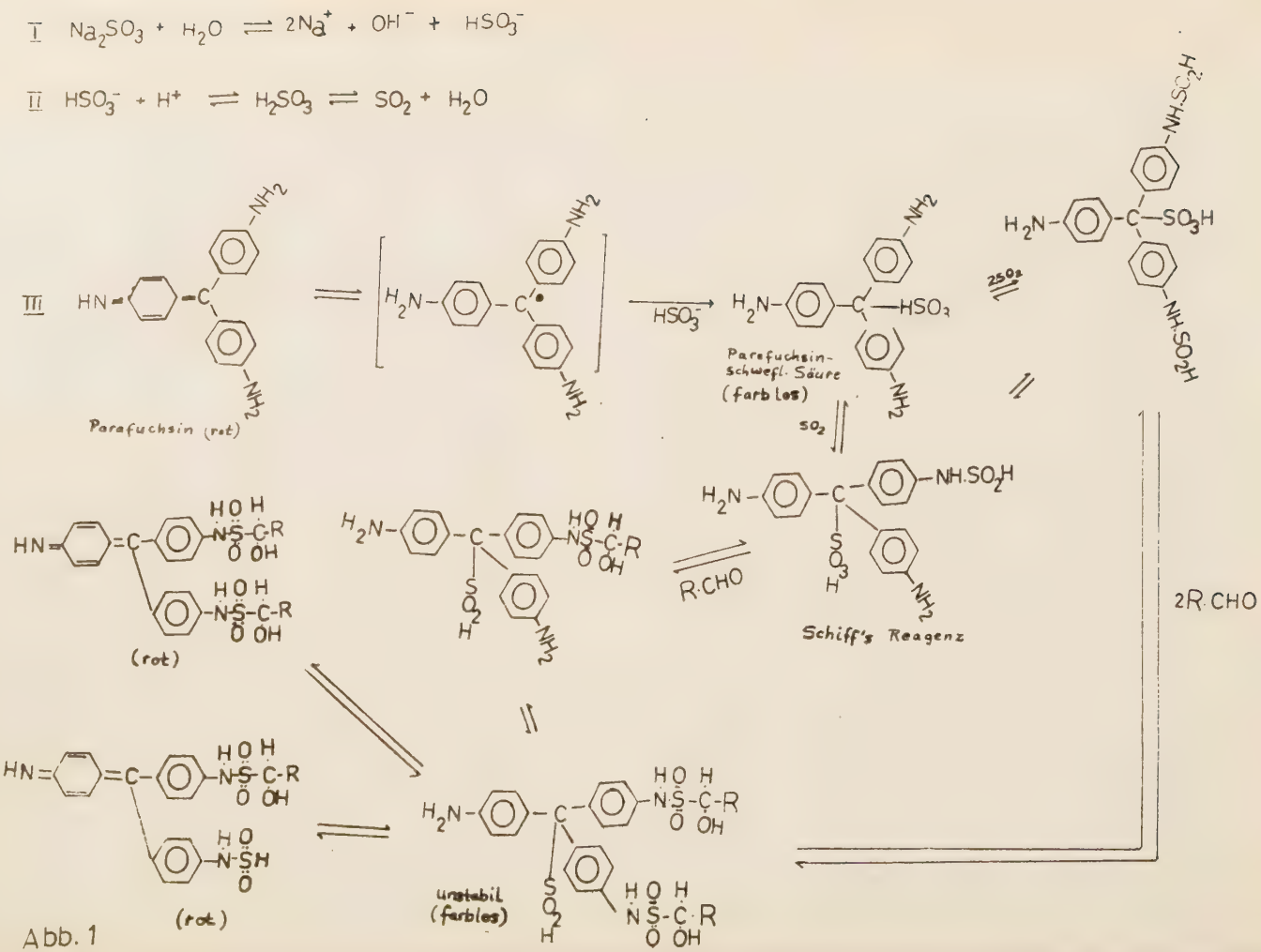

I $Na_2SO_3 + H_2O \rightleftharpoons 2Na^+ + OH^- + HSO_3^-$
II $HSO_3^- + H^+ \rightleftharpoons H_2SO_3 \rightleftharpoons SO_2 + H_2O$
III
Parafuchsin (rot)
HSO_3^-
Parafuchsin-schwefl. Säure (farblos)
SO_2
R·CHO
Schiff's Reagenz
2R·CHO
(rot)
(rot)
unstabil (farblos)

Abb. 1

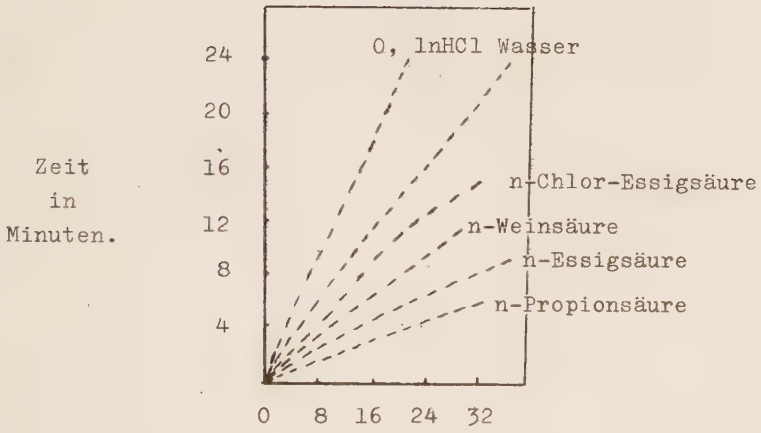


Abb. 2: Abhängigkeit der Farbintensität der Schiff'schen Reaktion von verschiedenen Säuren. [1] (nach Biddle, (1913).

1) Hierbei dürfte zu berücksichtigen sein, daß zumindest Essigsäure auf Grund ihrer Herstellung Azetaldehyd enthalten kann, was zu einer falschen positiven Reaktion führt.

Die Entstehung von Aldehyd im Stoffwechsel einiger Enterobakterien ist in Abb. 3 schematisch zusammengefaßt.

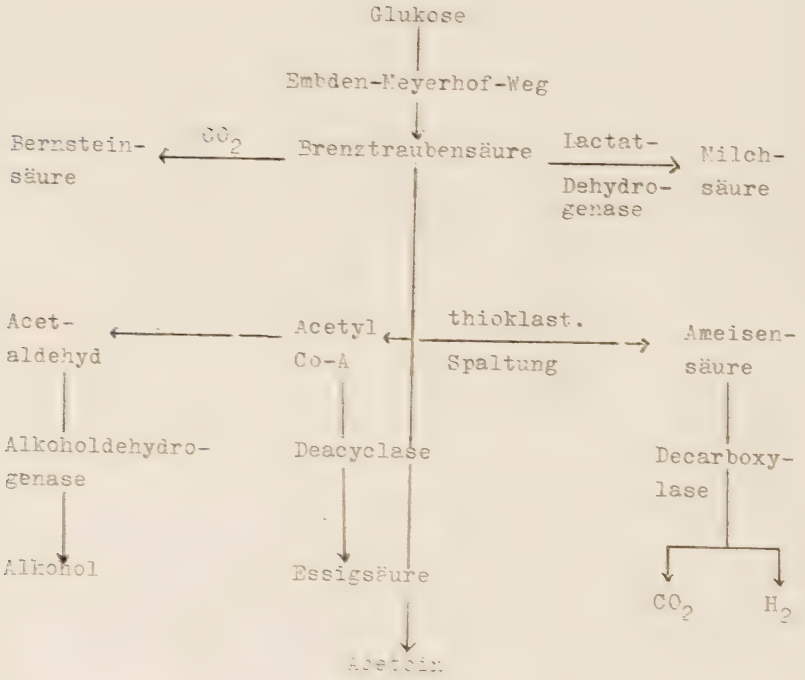


Abb. 3: Glukosevergärung durch E. coli.
verändert nach Clifton, 1947, Entner 1962)

Aus dem vorstehenden Schema geht hervor, daß an Endprodukten Kohlendioxyd, Wasserstoff, Essigsäure, Ameisensäure, Äthylalkohol, Milchsäure und Bernsteinsäure zu erwarten sind. Während der Gärung wird auch Acetaldehyd gebildet, was durch Zugabe von Bisulfit gezeigt wurde (Neuberg und Nord, 1919). Außerdem wurde eine Alkoholdehydrogenase nachgewiesen, die an NAD reversibel gebunden ist und Acetaldehyd in Alkohol umlagern kann (Still, 1940).

Bei dem "Coli-Typ der Gärung" werden die Kohlenhydrate nach dem Embden-Meyerhof-Schema abgebaut. Auch bei anderen Abbauwegen kann durch Mikroorganismen letztlich als Intermediärprodukt Acetaldehyd gebildet werden.

Einer dieser Wege beruht auf der Dehydrierung des Glucose-6-Phosphats zu 6-Phosphor-glukonlakton, das über Glukonsäure-6-phosphat zu Pentosen umgewandelt wird (Warburg-Dickens-Horecker-Schema). (Vergleiche auch für Pentosen, Seite 15.)

Cohen (1951) fand, daß ruhende Zellen von E. coli die Glukose hauptsächlich über das Embden-Meyerhof-Schema, die schnell wachsenden jedoch vorwiegend über den Pentose-Phosphat-Zyklus abbauen. Nach Cheldelin (1961) wird Glukose durch E. coli zu etwa 72 % über das Embden-Meyerhof-Schema und zu etwa 28 über den Pentose-Phosphat-Zyklus abgebaut.

Bei der Enterobakter-Klebsiella-Gruppe läuft die Glykolyse wie bei E. coli bis zur Brenztraubensäure ab. Danach kommt es zu einer Acetoinkondensation:

$$CH_3CHO + CH_3.CO.COOH \longrightarrow CH_3-\underset{\displaystyle COCH_3}{\overset{\displaystyle OH}{\overset{|}{\underset{|}{C}}}}-COOH \longrightarrow CH_3.CHOHCOCH_3 + CO_2$$

Bei der Acetoinbildung wird der Acetaldehyd zuerst auf Brenztraubensäure übertragen, wobei Acetolactat entsteht, das durch ein zweites Ferment in CO_2 und Acetoin gespalten wird (Holzer und Holdorf, 1957; Thimann, 1964).

Die Reaktionsprodukte des "Salmonella-Typs" der Gärung sind Essigsäure, Ameisensäure, Milchsäure und Alkohol. (Tab. 2)

Tabelle 2: Endprodukte (in Mol, auf jeweils 100 Mol umgesetzten Zucker bezogen) bei dem "Salmonellen-Typ" der Gärung (nach Friedemann 1938)

Organismus	Ameisensäure	Essigsäure	Alkohol	Alkohol + Essigsäure	Milchsäure
E. coli	19,8	41,4	45,6	87,0	81,6
Klebs.pneumon.	23,8	39,6	46,0	85,6	90,4
Salmon.typhosa	120,2	56,4	58,6	115,0	56,0
Salmon.schottm.	7,8	35,4	45,2	80,6	88,0
Salmon.enteritidis	27,8	32,6	42,2	47,6	100,0
Salmon.choleraesuis	40,4	42,0	45,0	87,0	96,6
Salmon.typhimurium	43,6	39,2	51,2	90,4	79,6
Shig.dysenteriae	83,4	43,6	42,5	86,2	87,6

Die Bildung von Acetaldehyd durch Shigella ist bei der Gärung von Mannit, Glycerin und Maltose nachgewiesen worden (Neuberg und Nord 1919). Bei der Vergärung anderer, energiereicher Substanzen müßte auch Aldehyd entstehen. Einzelheiten aus der Literatur fanden wir über Mannose. D-Mannose kann im Gegensatz zu D-Glukose durch ATP nicht

phosphoryliert werden. Stattdessen wird D-Mannose zu D-Glukose-6-Phosphat phosphoryliert, woraus D-Mannose-6-Phosphat und D-Glukose entstehen. D-Mannose kann auch über eine Umwandlung in Fruktose-6-Phosphat in den Embden-Meyerhof-Zyklus eintreten. (Kamel und Anderson, 1966) [1] Gleichfalls von Interesse ist die Vergärung von Alkoholen und Pentosen. Als Beispiele seien die von Mannit und Glycerin angegeben. Obwohl wenig über die Mannitgärung bekannt ist, kennt man doch eine Dehydrogenase in E. coli, die Mannit-1-Phosphat durch NAD^+ zu Fruktose-6-Phosphat oxidiert, (Fruton und Simmonds, 1953) wodurch der Weg der Mannitgärung verständlich wird.

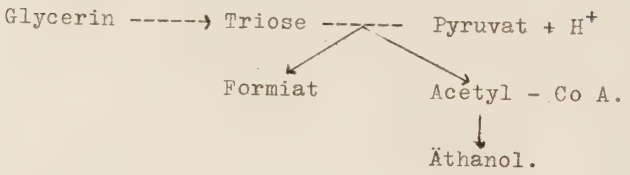
Einige Enterobakterien vermögen Glycerin zu vergären. Bei E. coli sind die Produkte hauptsächlich Alkohol, Milchsäure, Ameisensäure und CO_2, was bereits Harden (1901) feststellte. Bei der Vergärung von Glycerin durch E. coli in Gegenwart von Sulfit tritt ebenfalls Acetaldehyd in beträchtlicher Menge auf, und zwar auf Kosten von Äthylalkohol, der nach Harden gemäß der Gleichung
$C_3H_8O_3 \dashrightarrow HCOOH + C_2H_5OH$ normalerweise entsteht
(Neuberg und Nord, 1919).

Bei Aerobakter treten vor allem Äthylalkohol, Essig- und Ameisensäure auf. Läuft die Reaktion unter anaeroben Bedingungen ab, so kommt die Gärung zum Stillstand, lange bevor das gesamte Glycerin verwertet ist. Glycerin wird auch von anderen Bakterien (z. B. E. freundii) zu Trimethylenglykol bzw. Bernsteinsäure und Äthylalkohol vergoren.

---

1) Es kann jedoch auch Mannose mit einer unspezifischen Hexokinase in das 6-Phosphat umgewandelt und dann durch Phospomannoisomerase zu Fruktose-6-Phosphat isomerisiert werden.

E. freundii bildet Äthylalkohol über:



Pentosen werden von Enterobakterien in die gleichen Produkte wie Hexosen gespalten. Das Fragment mit 2 C-Atomen muß also zu einer Triose resynthetisiert werden und zwar durch Transketolase und Transaldolase, sowie durch das Coenzym Thiaminpyrophosphat (siehe Abb. 4).

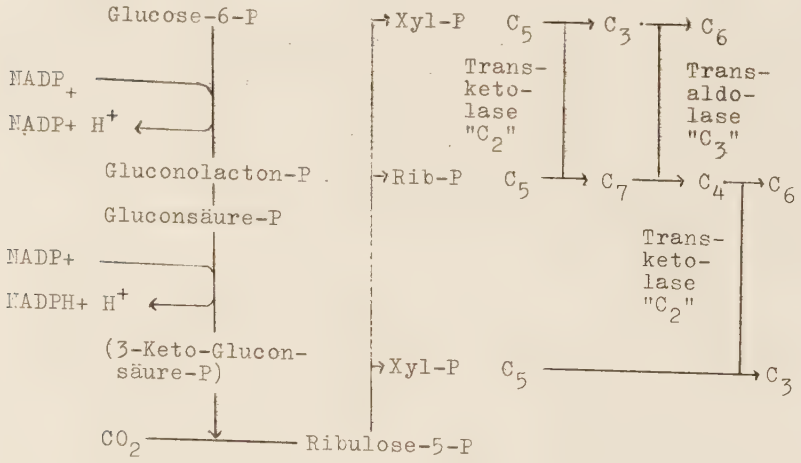


Abb. 4: "Pentosephosphatzyklus" (Hexosemonophosphat-Shunt). (Nach Karlson 1966)

Anm.: P = Phosphorsäure
Xyl-P = Xylulose-5-Phosphat
Rib-P = Ribose-5-Phosphat

Der Übersichtlichkeit halber sind im Schema nur die Zahl der Zucker-C-Atome und die transferierten Bruchstücke aufgezeichnet.

Diese Verlaufsreaktion wurde für Aerobacter aerogenes bestätigt. Ein ähnlicher Abbauweg ist bei Enterobacter und E. coli beobachtet worden (Mutting und Carson, 1952).

Extrakte aus E. coli bauen Sedoheptulose-7-Phosphat schneller bei Zusatz von Fruktose-6-Phosphat ab. Sedoheptulose ist der einzige 7-C-Zucker, der sowohl aerob als auch anaerob durch Bakterien und Hefen abgebaut wird. Bei Erwinia und Proteus scheint der Pentose-Phosphat-Zyklus von geringer Bedeutung zu sein.

Schlußfolgerung aus dem chemischen Teil.

Als Zwischenprodukt ist aus den Literaturangaben Azetaldehyd als Intermediärprodukt und Säuren als Endprodukte bei den Gärungen einiger Enterobakterien nachgewiesen worden. ENDO (1904) sowie Kendall (1916) und Lehmann und Neumann (1931) u. a. nahmen an, daß die "Endoreaktion" durch die Säuren hervorgerufen wurde. Wie Harding und Ostenberg (1912), Zinsser (1929) und auch Conn (1929) u. a. vermuteten, entsteht - sofern der jeweilige in der Endoplatte enthaltene Zucker von den Bakterien vergoren wird - Azetaldehyd, der im Medium wahrscheinlich durch die Schiff'sche Reaktion nachgewiesen wird. Für diese Tatsache spricht die Art der Herstellung des Mediums mit Fuchsin und Natriumsulfit und die verspätete Bildung von SO_2 aus HSO_3 nach Ansäuerung des Mediums mit Gärungsprodukten, wie SO_2 zur Herstellung des Schiff'schen Reagenz verwendet werden kann (zitiert nach Kasten, 1960). Ferner spricht hierfür die Färbung des Mediums nach dem Ablauf der Reaktion (die Endoplatte wird bekanntlich nicht

"fuchsinrot" nach der Kultur von E. coli sondern sie hat einen deutlichen rotvioletten Farbton), und letztlich die negative Beeinflussung der Reaktion im alkalischen pH-Bereich, was ebenfalls Kasten erwähnt. Überraschenderweise wird die Endoreaktion auch durch Oxidationsmittel wie H_2O_2, O_3 u. a. hervorgerufen. Dies beruht wahrscheinlich darauf, daß die Reaktion Fuchsin + $NaHSO_3$ fuchsinschweflige Säure in einer Richtung als Reduktion und in der anderen als Oxidation verlaufen kann, wobei die freigesetzte schweflige Säure (und das $NaHSO_3$) zu Sulfat oxidiert wird (Pseudoreaktion nach Kasten 1960). Hieraus erklärt sich die Tatsache, daß die Endoplatte bei längerem Stehen im Hellen allmählich rot wird. Solche Oxidationsmittel entstehen im Stoffwechsel der Bakterien nach Abb. 3 offenbar nicht.

III. Experimenteller Teil

Die Differenzierung der Arten und Gattungen der Enterobakterien wird u. a. mit Hilfe der Prüfung der Vergärung verschiedener Energiequellen (Mono- und Disaccharide, von Polysacchariden, Pentosen, Alkoholen und Glykosiden)durchgeführt. Da hierfür pro Stamm z. Z. mehrere Röhrchen mit den einzelnen Substanzen verwendet werden müssen, lag es nahe, die Testungen mittels der Endoplatte durchzuführen, da diese mit mehreren Stämmen radialstrichförmig beimpft werden kann und die Vergärbarkeit eines Zuckers o. ä. nicht über Säurebildung, sondern über eine chemische Nachweisreaktion, vermutlich die Schiff'sche Aldehydreaktion, abläuft.

Somit war zuerst zu untersuchen ob - wie theoretisch zu erwarten war - alle infrage kommenden Energiequellen, die bei den Testungen verschiedener Enterobakterien verwertet werden, auch auf der Endoplatte eine deutlich positive

Reaktion innerhalb eines Bebrütungszeitraumes von 1 - 2 Tagen ergeben. [1] Bei positivem Ergebnis war weiterhin zu untersuchen, ob die Farbreaktion auf der Endoplatte auch bei Strichbeimpfung genügend eindeutig abläuft, vor allem auch dann, wenn 5 - 6 Stämme auf eine Platte gebracht werden.

In der Folge der Untersuchung wurde ferner einzelnen Problemen der Endoplatte nachgegangen, so z. B. dem teilweisen Ausbleiben der normalerweise positiven Aldehydreaktion bei Klebsiella und Enterobacter.

a) Werden aus allen für die biochemischen Bestimmungen gebräuchlichen Energiequellen auf der Endoplatte Aldehyde gebildet?

Methodik:

Das Endomedium wurde wie folgt hergestellt: 500,0 ml Nähragar [2] werden im Dampftopf verflüssigt und anschließend 5,0 g des zu testenden Substrats und 2,0 g Natriumsulfit ($Na_2SO_3 \cdot 7H_2O$) oder 1,2 g wasserfreies Natriumsulfit (in A. dest. gelöst und aufgekocht) zugegeben. Danach wurden 1,8 ml alkohol. gesättigte Fuchsinlösung zugesetzt, gut durchgemischt und in Petrischalen ausgegossen. Der heiße Endonährboden hatte leichte rosa Färbung und war im kalten Zustand fast farblos.

Bei der Herstellung der Fuchsinlösung wurden 20,0 g Diamantfuchsin (Merck) und 200,0 ml 96%igen Äthylalkohol unter häufigem Schütteln 2 - 3 Stunden bei 60° C gehalten und dann abgekühlt.

---

1) Bekanntlich können in der medizinisch-mikrobiologischen Routine die für systematische Untersuchungen meist erforderlichen längeren Bebrütungszeiten nicht eingehalten werden.

2) 1 % Pepton,
1 % Fleischextrakt,
0,5 % NaCl, und
2,5 % Agar-Agar in agua dest.

Die Reinkulturen wurden anfangs mittels Dreiösenausstrich auf das Medium überimpft. Der Ausfall der Reaktion auf der Endoplatte wurde nach 15- bis längstens 48-stündiger Bebrütung bei 37° C abgelesen (siehe Tabellen 3 a - f).

Tabelle 3: Vergleich der aus der Literatur bekannten Angaben (L) über die Verwertung einzelner Zucker mit den von uns erhaltenen Reaktionen auf der Endoplatte (E).

3 a) Monosaccharide: (Hexosen)

Substrat	E. coli		Shig. sonnei		S.typhi murium		Entero-bacter [1]	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Glukose	+	+++	+	+++	+	+++	+	++
Fruktose	+	+++	+	+++	+	+++	+	++
Galaktose	+	+++	+	+++	+	+++	+	++
Mannose	+	+++	+	+++	+	+++	+	++
Rhamnose	+	++	+	+++	+	++	d	-

Substrat	Klebs. pneum.		Prot. mirab.		Provid.	
	L	E	L	E	L	E
Glukose	+	++	+	++	+	++
Fruktose	+	++	+	+	+	+++
Galaktose	+	++	+	++	+	++
Mannose	+	++	-	-	+	+++
Rhamnose	+	++	-	-	-	++ [2]

Anm. zu den Tabellen 3 a - f:

L = Substratverwertung nach Literaturangaben (Breed, u. a. 1957; Kaufmann, 1966)

+ = positiv
- = negativ
d = verschiedene biochemische Typen
x = verzögert positiv oder negativ

E = Reaktion auf den modifizierten Endoplatten:

+++ = dunkelrote Kolonien mit Fuchsinglanz
++ = rote Kolonien
+ = hellrote, aber eindeutig positive Kolonien
- = farblose Kolonie, d. h. die entsprechenden Kolonien wiesen gegenüber der frischbereiteten, bebrüteten, aber nicht beimpften Endoplatte keine sichtbaren Veränderungen auf.

1) Dieser Name wurde von Hormaeche und Edwards (1960) für "Cloaca" vorgeschlagen und von Kauffmann (1966) übernommen.

2) Nach Kaufmann (1966) soll Providencia aus Rhamnose keine Säure bilden. Shaw und Klark (1955) haben in ihrer Arbeit jedoch gezeigt, daß 4 % der Providencia-Stämme auch Säure bilden können.

b) Monosaccharide: Pentosen

Substrat	E. coli		Shig. sonnei		S.typhi murium		Entero-bacter	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Arabinose	+	+++	+	+++	+	+++	+	++
Xylose	+	+++	d	-	+	++	+	++

Substrat	Klebs. pneum		Prot. mirab.		Provid.	
	L	E	L	E	L	E
Arabinose	+	++	-	-	-	-
Xylose	+	++	+	++	-	-

c) Disaccharide

Substrat	E. coli		Shig. sonnei		S.typhi murium		Entero-bacter	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Cellobi-ose	+	+++	-	-	-	-	+	++
Laktose	+	+++	-	-	-	-	d	++
Maltose	+	++	+	++	+	+	d	-
Saccha-rose	d	+++	x	++	-	-	+	++
Treha-lose	+	+++	+	+++	+	+++	+	++

Substrat	Klebs. pneum		Prot. mirab.		Provid.	
	L	E	L	E	L	E
Cellobi-ose	+	++	-	-	-	-
Laktose	+	++	-	-	-	-
Maltose	+	++	-	-	-	-
Saccha-rose	+	++	x	-	x	-
Treha-lose	+	++	+	++	-	-

d) Polysaccharide

Substrat	E. coli		Shig. sonnei		S.typhi murium		Entero-bacter	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Dextrin	-	-	-	-	-	-	+	++
Glykogen	-	-	-	-	-	-	-	-
Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
Pectin	x	-	-	-	+	+	-	-
Raffino-se	d	+	+	++	-	-	+	++
Stärke	-	-	-	-	-	-	-	-

Substrat	Klebs. pneum		Prot. mirab.		Provid.	
	L	E	L	E	L	E
Dextrin	+	+	-	-	-	-
Glykogen	-	-	-	-	-	-
Inulin	d	-	-	-	-	-
Pectin	+	++	-	-	-	-
Raffino-se	-	-	-	-	-	-
Stärke	+	++	-	-	-	-

e) Glykoside

Substrat	E. coli		Shig. sonnei		S.typhi murium		Entero-bacter	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Salicin	d	+++	-	-	-	-	+	++
Äsculin	d	-	-	-	-	-	-	-

Substrat	Klebs. pneum		Prot. mirab.		Provid.	
	L	E	L	E	L	E
Salicin	+	++	-	-	-	-
Äsculin	+	++	-	-	-	-

f) Alkohole

Substrat	E. coli		Shig. sonnei		S.typhi murium		Entero-bacter	
	L	E	L	E	L	E	L	E
Adonit	-	-	-	-	-	-	d	+
Dulcit	d	+	d	-	+	++	-	-
Inosit	-	-	-	-	d	+	d	+++
Glycerin	-	-	-	-	-	-	+	++
Mannit	+	++	+	+++	+	+++	+	++
Sorbit	+	+++	-	-	+	+++	+	++

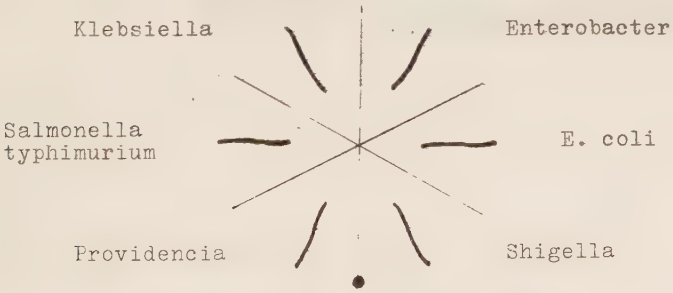
Substrat	Klebs. pneum.		Prot. mirab.		Provid.	
	L	E	L	E	L	E
Adonit	+	++	-	-	-	-
Dulcit	d	++	-	-	-	-
Inosit	+	++	-	-	+	++
Glycerin	+	++	-	-	-	-
Mannit	+	++	-	-	-	-
Sorbit	+	++	-	-	-	-

Aus den Tabellen 3 a - f ergibt sich, daß auf allen Platten, auf denen Säurebildung zu erwarten war, auch gleichzeitig eine Rotfärbung der Kolonien vorlag. Providencia hat sich jedoch in unseren Untersuchungsreihen auf Rhamnose vorwiegend als positiv auf der Endoplatte ausgezeichnet. (Vergl. Fußnote 2) Seite 20)

b) Verwerdung der Endo-Platte als Inditatormedium zur biochemischen Bestimmung von Enterobakterien.

Für die Frage, ob die Methodik auch in der Routine verwendbar ist, mußte weiterhin geklärt werden, ob störende Reaktionen eintreten, wenn die Beimpfung der Endoplatten mit den verschiedenen Zuckern etc. und 6 Stämmen pro Platte vorgenommen wird. Eine Zeitersparnis für den Routinebetrieb kann nämlich erst durch die Mehrfachbeimpfung einer Platte eintreten

Die Ergebnisse einiger Versuchsreihen sind in den Abb. 5 - 9 dargestellt.



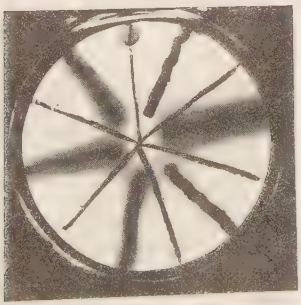


Abb. 5: Glukose als Substrat in den Endoplatten wurde von allen Stämmen vergoren.

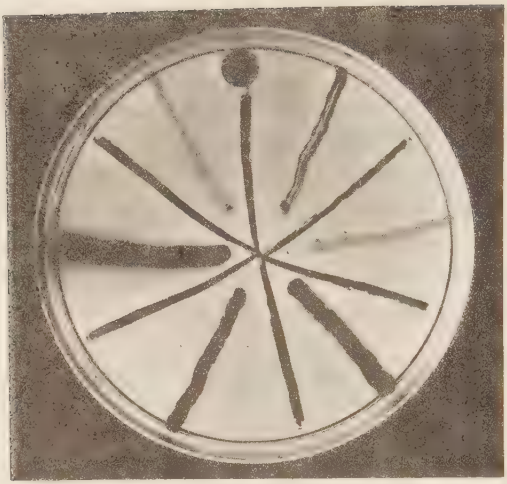
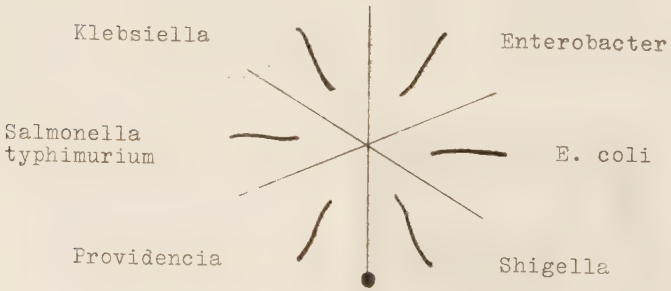


Abb. 6: Laktose als Substrat in den Endoplatten wurde mit Ausnahme von Salmonella typhimurium und Shigella (24 h. Bebrütung) vergoren.



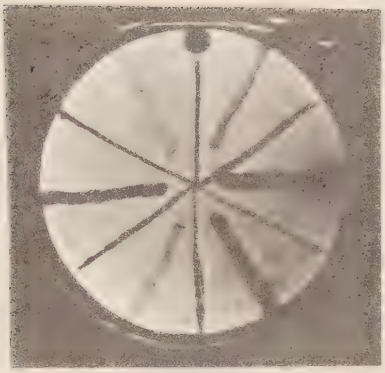
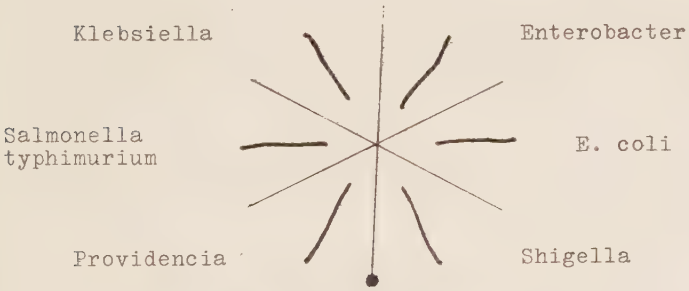


Abb. 7: Dulcit als Substrat in den Endoplatten wurde von Klebsiella, Salmonella typhimurium u. E. coli vergoren.



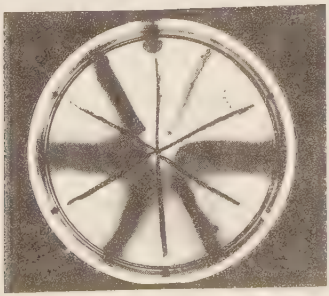


Abb. 8: Mannit als Substrat in den Endoplatten wurde nur von Providencia nicht vergoren.

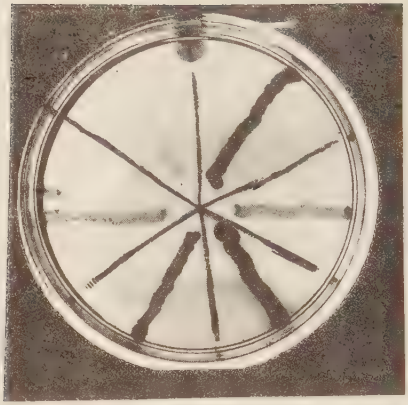


Abb. 9: Inosit als Substrat in den Endoplatten wurde von Enterobacter, Klebsiella und Providencia vergoren.

Die abgebildeten Reaktionen auf den Endoplatten mit verschiedenen Substraten lassen sich auch bei Wiederholungen sicher ablesen und entsprechen den Reaktionen in der normalen "Bunten Reihe" (Fleischextraktboullon + Indikator + Substrat).

IV. Diskussion der Ergebnisse

Die Endoplatte ist, obwohl seit ihrer Einführung mehr als 60 Jahre vergangen sind, ein nützliches Selektiv- und Indikatormedium geblieben, da die Hemmung Gram-positiver Bakterien mit einigen Ausnahmen gut gelingt und die Vergärung der Laktose bei Gram-negativen Bakterien meist deutlich angezeigt wird. Es überraschte uns daher, daß über den Mechanismus der positiven Nachweisreaktion verschiedene Meinungen in der Literatur bestehen und der Versuch einer möglichst vollständigen Erklärung uns nicht bekannt geworden ist.

Nachdem Endo angenommen hatte, daß es sich bei der Reaktion um einen einfachen pH-Effekt handelte, setzte sich später die Meinung durch, daß der bei der Vergärung entstehende Azetaldehyd für die Reaktion verantwortlich sei. Mithin wurde an die Schiff'sche Aldehyd-Reaktion gedacht, doch wurde dieser Nachweis im Zusammenhang mit der Endoplatte selten erwähnt und Gedanken über Redoxreaktionen geäußert und diskutiert, ob der nach einer positiven Reaktion entstehende Farbstoff das ursprüngliche Fuchsin oder aber ein neuer Farbstoff sei.

Die Verlaufsreaktion der Schiff'schen Reaktion in der Cytologie (vgl. Abb. 1, S. 9a) scheinen die Hypothese von Margolena u. a. (S. 6 - 8) zu bekräftigen. Danach zeichnen sich die roten Endprodukte der Reaktion dadurch aus, daß sie gleichzeitig eine chinoide- und eine benzoide Struktur haben. Solche Verbindungen sind stets kräftig gefärbt. Es ist seitens der Chemie noch nicht eindeutig geklärt, warum andere Substanzen wie Oxidationsmittel und Ketone einen falsch-positiven Effekt auf der Endoplatte hervorrufen. Falsch-positive Reaktionen bei histologischem Material sind aus zahlreichen Versuchen bekannt.

Der Reaktionsablauf auf der Endoplatte stellt sich nach den Literaturangaben nun so dar, daß sowohl das gebildete Aldehyd als auch die Säuren für den positiven Ausfall der Reaktion entscheidend sind. Erst die Säuren bewirken eine Freisetzung von SO_2 aus dem nicht gebundenen HSO_3-Ion, und erst hierdurch kann es zum Einsetzen der Farbstoffbildung in Aldehydgegenwart kommen.

Die von uns häufig beobachtete Erscheinung, daß Enterobacter und Klebsiella bei starker Beimpfung in der oberen Hälfte eines Dreiösenausstriches beispielsweise eine positive Aldehydreaktion nur an den Rändern des Bakterien-

rasens zeigen, wo ein niedriger pH-Wert ausgebildet wurde als in der Mitte des Rasens, findet auf diese Weise eine Erklärung. Es bleibt freilich unklar, warum an den Rändern des Rasens mehr bzw. in der Mitte weniger Säuren gebildet werden. Inwieweit eine verschieden starke Alkalibildung die Reaktion beeinflußt, ist nicht bekannt.

Die experimentellen Untersuchungen haben ergeben, daß - sofern eine energieliefernde Substanz vergoren werden kann - die vermutete Schiff'sche Reaktion auf der Endoplatte ebenfalls positiv wird. Somit ergibt sich auch die Möglichkeit, die Endoplatte - beschickt mit anderen vergärbaren Substanzen - als Äquivalent zu den "Bunten Reihen" zu benutzen. Dies hat den Vorteil, daß auf einer Endoplatte bis zu 6 Bakterienstämme strichförmig von außen nach innen beimpft werden können, wodurch Zeit- und Materialersparnis gegeben ist. Ob sich die Methode auch in der Routine ohne weitere Veränderungen bewährt, muß sich erst erweisen.

V. Zusammenfassung

1) Aus unserer Literaturzusammenstellung ergab sich, daß ursprünglich die bei einer positiven Reaktion entstehende Rotfärbung auf einer Säurebildung beruhen sollte. Später setzte sich die Anschauung durch, daß sich auf der Endoplatte eine Nachweis-Reaktion für Aldehyde abspielt. Ein chemischer Beweis für einen Aldehyd-Nachweis im Sinne einer Schiff'schen Reaktion ist jedoch bislang nicht geführt worden.

2) Wie aus der Theorie der Vergärung von energieliefernden Substraten vermutet werden konnte, werden im positiven Falle der Verwertung eines Zuckers o. ä. von Enterobakterien immer Aldehyde gebildet. Dementsprechend wird in jedem positiven Fall die Endoplatte gerötet.

3) Die Endoplatte kann nach Zusatz von anderen Zuckern o. ä. als Medium zur biochemischen Bestimmung von Enterobakterien verwendet werden. Hierfür können Endoplatten mit Mannit, Dulcit, Saccharose etc. mit je 6 Reinkulturen von Enterobakterien beimpft werden, ohne daß eine gegenseitige Beeinflussung stattfindet. Infolge einfacher Beimpfung und nur relativ kurzer Bebrütungszeit dürfte sich eine Vereinfachung bei der biochemischen Bestimmung von Enterobakterien in der Routine ergeben.

VI. Literatur-Verzeichnis

1. Allen, S. H. G. and Powelson, D.: "Pathways of glucose oxydation in diving and nondiving cells of E. coli." J. Bact. 75: 184 - 189 (1958).

2. Anonym. The Society of American Bacteriologists: Manual of microbial Products. Mc Graw-Hill, New York, London, Toronto, (1967).

3. Breed, R. S., Murray, E. G. D., Nathan, R. S. u. a.: Bergeys Manual of Determinative Bacteriology, 7. Aufl., Bailliere, Tindall & Co., London, (1957).

4. Biddle, H. C.: J. Am. Chem. Soc. 35, 273, (1913).

5. Burrows, W.: Bacteriology. W. B. Saunders Co., Philadelphia, London, (1949).

6. Castellani, A. und Chalmers, A. J.: "Sur la Classification de certains Groupes de Bacilles Aérobies de l'Intestin Humain." Ann. Inst. Pasteur, 34, 600 - 621, (1920).

7. Cheldelin, V. H.: Chemistry of microbial products. Wiley, New York, (1961).

8. Christensen, V. H.: "Urea decomposition as a means of differentiating Proteus and Paracolon cultures from each other and from Salmonella and Shigella Types." J. Bact. 52: 461 - 466, (1946).

9. Conn, H. J.: Stain Techn. 1, 57, (1929).

10. Clifton: Introduction to Bacterial Physiology. New York: Mc Graw-Hill, 348 - 349, (1957).

11. Cochen, S. S.: "Symposium on growth of bacterial virus in host cell; biochemical studies on multiplication of bacterial viruses." Fed. Proc. 10, 585 - 590, (1951).

12. Darany, J. V.: "Haltbare Modifikation des Fuchsinnährbodens nach ENDO." Münchn. med. Wschr., 1001, (1928).

13. Difeco Manual of dehydredated culture media and reagents for microbiological and clin. laboratory procedure. 9. Aufl. Difeco laboratories incomp. Detroit, 1, Michigan, pp 34 - 35, (1962).

14. Dold, H. und Ketterer, M.: "Vergleichend Untersuchungen über die Nachweisbarkeit von Ruhrbazillen in flüssigem und trockenem Stuhlmaterial." Ztschr. f. Hyg., 125, 215, (1944).

15. Dubos, R. J.: Bacterial and mycotic infections of man. 3. Aufl., Lippincot Co., Philadelphia, Montreal,(1958).

16. Edwards, P. R. and Ewing, E. H.: Identification of Enterobacteriaceae, 3. Aufl., Burgess, St. Mineapolis, (1961).

17. Endo, S.: "Über ein Verfahren zum Nachweis der Typhusbaziilen." Zbl. Bakt. I, Orig. 35, 109 - 110, (1904).

18. Fieser, L. E. und Fieser, M.: Lehrbuch der organischen Chemie. 4. Aufl., Verlag Chemie, Weinheim, (1960).

19. Fruton, J. and Simmonds, S.: General Biochemistry. New York, (1953).

20. Haehn, H.: Biochemie der Gärung, W. Gruyter, Berlin, (1952).

21. Hallmann, L.: Bakteriologische Nährböden. Thieme, Stuttgart, (1953).

22. Hallmann, L.: Bakteriologie und Serologie. 2. Aufl. Thieme, Stuttgart, (1955).

23. Harden, A.: Alkoholic Fermentation. 3. Aufl. Longmanns, Green, London, (1923).

24. Harding, E. R. und Ostenberg, Z.: "Studies on Endo's medium with observations on the differentiation of bacilli of the para-typhoid group." T. Inf. Dis. 11, 109 - 115, (1912).

25. Hollmann, S.: "Nicht-glykolytische Stoffwechselwege der Glukose (Pentose-Abbau durch Mikroorganismen)," Thieme, Stuttgart, (1961).

26. Hormäche und Edwards, P. R.: "Proposal for the reaction of the genetic name Cloaca Castellani and Chalmers and proposal of Enterobacter as a generic name with designation of type species and of its type culture." Int. Bull. Bact. Nom. u. Tax. 10, 75 - 76, (1960).

27. Jones, H. N. und Wise, L. E.: "Cellobiose as an aid in the identification of members of the colon-aerogenes group of Bacteria." J. Bact. 27, 165 - 174, (1926).

28. Karlson, P.: Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 5. Aufl., Thieme, Stuttgart, (1966).

29. Karrer, P.: Lehrbuch der organischen Chemie. Thieme, Stuttgart, (1963).

30. Kasten, F. H.: "The chemistry of Schiff's Reagent." Int. Rev. Cytology. 10, 1 - 93, (1960).

31. Kamel, M. Y. und Anderson, R. L.: "D-Mannose metabolism in A. aerogenes." J. Bact. Vol. 92, 1689, (1966).

32. Kaufmann, F.: "Ein kombiniertes Anreicherungsverfahren für Typhus- und Paratyphusbazillen." Zbt. f. Bakt. Orig. I, 119, 148 - 152, (1930 - 1931).

33. Kaufmann, F.: Die Bakteriologie der Salmonellaspecies. Munksgaard, Copenhagen, (1961).

34. Kaufmann, F.: The Bacteriology of Enterobacteriaceae. Munksgaard, Copenhagen, (1966).

35. Kelly, F. C. und Hite, K. E.: Bacteriology. Appleton-Century-crofts, Incl., New York, (1949).

36. Kendal, A. T.: Bacteriology. Lea and Febinger, Phila, P. 201, (1916).

37. Köhler, W. und H. Mochmann: Grundriß der medizinischen Mikrobiologie. G. Fischer Verlag, Jena, (1962).

38. Kramptz, L. O.: "Bacterial Metabolism." Annual Review of Microb. 4, 67 - 100, (1950).

39. Lamanna, G. und Mallette, M.: Bacterialogy. The Williams and Wilkinson Co., Baltimore, (1965).

40. Lapage, S. P., et alt.: "Beta-galactosidase and lactose fermentation in the identification of enterobacteriaceae including Sallmonella." J. Chromatogr. 12, 236 - 241, (1963).

41. Lehmann und Neumann: Determinative Bacteriology. Vol. 2, Stechert and Co, New York, pp 386 - 387, (1931).

42. Leuthardt, F.: Lehrbuch der physiologischen Chemie. 5. Aufl. De Gruyter, Berlin, (1963).

43. Lichstein, H. C.: "Metabolism of Microorganisms." Annual Rev. Microb. 6, 1 - 26, (1952).

44. Linde, K.: Grundriß der Mikrobiologie für medizinische Assistenten. G. Thieme, Leipzig, (1963).

45. Lindemann, J.: Einführung in die bakteriologische Diagnostik. Karger, Basel, New York, (1960).

46. Maschall, F.: "Die Bedeutung des Endo-Nährbodens für die bakteriologische Typhusdiagnostik." Ztb. Bakt. 1 Orig. 38, 347 - 359, (1905).

47. Margolena, L. H. und Hansen, P. A.: "The nature of the reaction of the colon organisms on Endo's Medium." Stain techn. 8: 131 - 136, (1932 - 1933).

48. Meyerhof, O. und Kiesling, W.: "Über das phosphorylierte Zwischenprodukt und die letzte Phase der alkoholischen Gärung." Bioch. Ztschr. 167: 313 - 348, (1934).

49. Meyerhof, O. und Kiesling, W.: Über die enzymatische Umwandlung von Glycerin-Aldehyd-Phosphorsäure in Dioxyacetonphosphorsäure. Bioch. Ztschr. 279: 40 - 48, (1935).

50. Meyerhof, O. und Kiesling, W.: "Über den enzymatischen Umsatz der synthetischen Phosphorbrenztraubensäure." Bioch. Ztschr. 280: 99 - 108, (1936).

51. Moeller, V.: "Distribution of aminoacid-decarboxylases in Enterobacteriaceae." Acta path. et. Microbiol. Scand. 35: 259 - 277, (1954).

52. Müller, R.: Medizinische Mikrobiologie. 4. Aufl. Urban und Schwarzenberg, München / Berlin, (1950).

53. Nakamura, M. und Clausen, C.: "Lactose fermentation by Shigella sonnei." Nature, London, 196: 44 - 46, (1962).

54. Neilands, J. B. und Stumpf, P. K.: Outlines of enzyme chemistry. Wiley, New York, (1955).

55. Neuberg, C. und Nord, F.: "Anwendung der Abfangmethode auf die Bakteriengärungen: 1). Acetaldehyd als Zwischenstufe bei der Vergärung von Zucker, Mannit und Glycerin durch Bakt. Coli, durch die Erreger der Ruhr und des Gasbrands. 2). Feststellung der Aldehydstufe bei der Essiggärung." Biochem. Ztschr. 96: 133 - 157, (1919).

56. Neuberg, C., Hirsch, J.: "Über den Verlauf der Alkoholischen Gärung bei alkalischer Reaktion." Biochem. Ztschr. 96: 175 - 202, (1919).

57. Nutting, L. A. and Carson, S. F.: Lactic acid fermentation of glucose by E. coli; fermentation studies, J. Bact. 63: 575 - 580, (1952).

58. O'Kane, D. J.: Metabolism of carbohydrates and related compounds. Annual rev. Microbiol. 10: 275 - 306, (1956).

59. Rapoport, S. M.: Medizinische Biochemie. 3. Aufl. Verb-Verlag, Berlin, (1965).

60. Reploh, H.: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie und Infektionskrankheiten. G. Fischer Verlag, Stuttgart, (1961).

61. Rewo, W. und Shukowa, M. D.: Veterinärmedizinische Mikrobiologie. G. Fischer Verlag, Jena, (1963).

62. Robinson, R.: The significance of phosphoric esters in metabolism. University Press, New York, (1932).

63. Salle, A. J. Laboratory Manual on Fundamental Principles of Bacteriology. 4. Aufl., Mc Graw-Hill Book Co., Inc., (1954).

64. Schriek, W.: "Die Verwendung von Saccharoseplatten zur Isolierung pathogener Erreger aus dem Stuhl." Zbl. f. Bakt. Orig., 143, 215 - 224, (1938 - 1939).

65. Seiffert, G.: "Zur Verbesserung der bakteriologischen Ruhrdiagnose." Zbl. f. Bakt. Orig. 148, 305 - 309. (1942).

66. Seiffert, G.: "Zur Vereinfachung der Diagnose pathogener Bakterien." Zbl. für Bakt. Orig. 148, 310 - 314, (1942).

67. Seymur, S. C.: "The role of the oxydative pathway of glucose-6-phosphate degeneration in growing and virus infected E. coli." A symposium on phosphorus metabolism. The Johns Hopkin Press, Baltimore, (1951).

68. Shaw, C. and Clark, Ph.: "Biochemical Calssifications of Proteus and Providencia cultures." J. Gen. Microbiol. 13, 155 - 161, (1955).

69. Stephenson, M.: Bacterial Metabolism. 3. Aufl. Longmanns Green and Co., London, New York, Toronto, (1952).

70. Squibb, E. R.: "Lectures on Chemistry of microbial products." V. H. Cheldelin: Metabolic Pathways in microorganism. Wiley, New York, London, (1961).

71. Still, J. L.: "Alkohol enzyme 57 Bact. Coli." Biochem. J. 34, 1177 - 1182, (1940).

72. Stuart, C. A. and Wheeler, K. M.: "Further study on anaerobic paracolon organism. Type 29911." J. Bact. 52, 431 - 438, (1946).

73. Thimann, K. V.: Das Leben der Bakterien, 2. Aufl. Jena, (1964).

74. Umbreit, W.: "Metabolism of Microorganism." Annual Review of Microbiol. 3, 81 - 96, (1949).

75. Wieland, H. und Scheuing, G.: "Die fuchsinschweflige Säure und ihre Reaktion mit Aldehyden." Ber. d. Deut. Chem. Abt. B. 54, 2527 - 2555, (1921).

76. Woods, D. D.: "Bacterial Metabolism." Annual Review of Microbiol. 1, 115 - 140, (1947).

77. Zinsser, H.: Textbook of Bact., Appleton of Co. New York, 130, (1929).

DANKSAGUNG

Herrn Professor Dr. med., Dr. phil., Dipl. chem. W. Zimmermann möchte ich an dieser Stelle für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit sowie für seine freundliche Unterstützung in Fachfragen danken.

Mein Dank gilt auch Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. R. Schweisfurth, der mich bei der Durchführung dieser Arbeit vielfach beriet und mich zugleich in die Methodik der Bakteriologie einführte.

Herrn Dr. Specht, Histologisches Institut der Universität des Saarlandes und Herrn Dr. Nischk, Bakteriologisches Institut der medizinischen Fakultät Aachen, danke ich für wertvolle Literaturhinweise.

LEBENSLAUF

Ich wurde am 20.1.1940 in Masaka / Uganda geboren. Von 1948 bis 1954 war ich Schüler der Primary School in Nkoni / Uganda. Von 1955 bis 1960 besuchte ich die Secondary School in Kitovu / Uganda. Von März 1961 bis August 1961 habe ich in Köln-Deutz bei den Weissen Vätern deutsch gelernt. Von Oktober 1961 bis Oktober 1962 habe ich das Studienkolleg bei der Universität des Saarlandes zu Saarbrücken besucht. Im Wintersemester 1962 / 1963 habe ich Naturwissenschaft in Saarbrücken studiert. Seit SS 1963 bis zum Abschluß meines Studiums war ich ordentl. Studierender der Medizin an dieser Universität. 1964 (April) habe ich mein Vorphysikum, 1965 (Oktober) mein Physikum und das Staatsexamen mit der Note "gut" bestanden.